Aus dem Institut für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin
der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. Schmahl

UNTERSUCHUNGEN ZUR AUFNAHME, ZUR VERTEILUNG, ZUM STOFFWECHSEL UND ZU DEN WIRKUNGEN DES DICHLORMETHANS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Norbert Gerhard Zwiker
aus Stuttgart
1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin
der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. Schmahl

UNTERSUCHUNGEN ZUR AUFNAHME, ZUR VERTEILUNG, ZUM STOFFWECHSEL UND ZU DEN WIRKUNGEN DES DICHLORMETHANS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Norbert Gerhard Zwiker
aus Stuttgart
1983

Dekan:	Prof. Dr. med. G. Fichtner
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Weichardt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H.-J. Mittmeyer

Herrn Professor Dr. H. Weichardt möchte ich für die Stellung des Themas danken. Herrn Prof. Dr. H. Zorn danke ich für seine großzügige Unterstützung und für zahlreiche Anregungen zu dieser Arbeit. Besonderer Dank gebührt außerdem Herrn Schatenberg für seine Mithilfe und seine ständige Einsatzbereitschaft sowie Frl. Pfeiffer für die perfekte Erledigung der Schreibarbeiten und meiner Frau Heidemarie für ihre Mithilfe bei der Pflege der Versuchstiere und bei der Erstellung der Graphiken.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S Seite

1. EINLEITUNG 1

2. ALLGEMEINER TEIL 3

2.1. Physikalische und chemische Eigenschaften von Dichlormethan 3

2.2. Verwendung von Dichlormethan 4

2.3. Metabolismus von Dichlormethan 5

2.4. Maximaler Arbeitsplatz - Konzentrationswert/ Biologischer Arbeitsstoff - Toleranzwert 9

2.5. Toxikologie von Dichlormethan 11

3. PROBLEMSTELLUNG 20

4. EXPERIMENTELLER TEIL 21

4.1. Aufbau der Experimentalanlage 21

4.2. Gaschromatographische Analytik 25

4.3. Beurteilung der gaschromatographischen Analytik - Verfahren 26

4.4. Eingesetzte Tiere 27

4.5. Versuchsdurchführung 28

5. ERGEBNISSE 33

5.1. Gasanalytik 33

5.2. Symptome und klinisch-chemische Befunde bei den mit Dichlormethan exponierten Tieren 42

5.3. Laborchemische Parameter 48

6. DISKUSSION 52

6.1. Metabolismus 52

6.2. Kinetik 54

6.3. Speicher- und Kumulationsvorgänge bei Dichlormethanexposition 55

6.4. Toxikologische Symptome 56

7. ZUSAMMENFASSUNG 57

8. LITERATUR 59

LEBENSLAUF 65

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0049

1. EINLEITUNG

Die zunehmende industrielle Bedeutung halogenierter Kohlenwasserstoffe ist auf die nahezu ideale Kombination wünschenswerter physikalischer und chemischer Eigenschaften, die beim Umgang ein großes Maß an Sicherheit gewährleisten, zurückzuführen. Seit der Jahrhundertwende und besonders in den letzten 30 Jahren werden halogenierte Kohlenwasserstoffe aufgrund ihrer vielseitigen Anwendbarkeit hergestellt, ohne daß bislang über alle diese Stoffe Untersuchungen zur Toxikokinetik und Toxikodynamik erfolgten. Viele der halogenierten Kohlenwasserstoffe besitzen noch nicht einmal eine Warnwirkung durch ihren Geruch; dieser wird im Gegenteil sowohl am Arbeitsplatz als auch bei "Do it yourself" und Haushaltsarbeiten als angenehm empfunden.

Nahezu allen halogenierten Kohlenwasserstoffen ist jedoch eine akute Einwirkung auf das Zentralnervensystem mit Symptomen im Sinne eines praenarkotischen Katersyndroms eigen. Bei einem Teil der halogenierten Kohlenwasserstoffe wird einige Stunden nach der Intoxikation über einen Anstieg der Transaminasen und einen Abfall der Gerinnungsfaktoren berichtet.

Mit der Einführung von Halogenen in das Alkangerüst steigt die narkotisierende Wirkung; diese ist aber nicht mit der Toxizität gleichzusetzen. Auch Dichlormethan wurde früher unter dem Namen Solaesthin als Kurznarkotikum angewandt, obwohl eine leichte Reizung der Schleimhäute, der Haut, der Cornea und der Bronchien und eine Atemdepression beschrieben sind.

In der Reihenfolge der Halogene $J < Br < Cl < F$ steigt die Stabilität der Halogen-Kohlenwasserstoff-Verbindungen.

Fluorverbindungen sind außerordentlich stabil, auch im Organismus; dagegen sind die entsprechenden Jodverbindungen so labil, daß sie bereits in vitro Jod abgeben. Bei Chlorverbindungen wird angenommen, daß sie in vivo und in vitro oxidativ dehalogeniert werden (1). Verschiedene Mechanismen werden dabei diskutiert:

1. Bei Alkanen: die Bildung freier Radikaler z.B. bei Tetrachlorkohlenstoff.
2. Bei Alkenen: die Bildung von Epoxiden, was z.B. für Trichloräthylen vermutet wird.
3. Bei einigen Alkan- und Alkenverbindungen unterbleibt eine Dehalogenierung zugunsten einer Hydroxylierung und Alkoholesterbildung bzw. einer Säurebildung.

Der Xenometabolismus ist bei den halogenierten Kohlenwasserstoffen oft die Ursache für den toxikodynamischen Effekt, das heißt, der Metabolit des primär aufgenommenen halogenierten Kohlenwasserstoffes kann toxikologisch bedeutsamer sein als die primär aufgenommene Substanz. Besonderes Interesse dürfte dem Dichlormethan gelten, nachdem seit 1972 bekannt ist, daß einer seiner Metabolite das Kohlenstoffmonoxid ist (3,4).

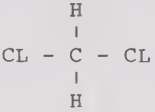
2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Physikalische und chemische Eigenschaften von Dichlormethan

Synonyma: Methylenchlorid
Methylendichlorid
Methylenbichlorid
Methylenum chloratum

Chemische Bezeichung: Dichlormethan

Formel:



Molekulargewicht:	84,93
Schmelzpunkt:	- 96,7° C
Siedepunkt:	40,1° C
Dichte:	1,326
Verdunstungszahl:	2
Dampfdruck bei 20° C:	457 Torr
Krit. Temp.:	235° C

1 ppm = 3,530 mg/m^3 bzw. 1mg^3 = 0,283 ppm

Das klare, farblose, haltbare und schwer entflammbare Dichlormethan stellt eine Flüssigkeit dar, die in Wasser schwer (1:40), in Alkohol, Äther und Ölen leicht löslich ist. Es ist bis 120° C beständig. Die Darstellung erfolgt durch Chlorierung von Methan. Als Zwischenprodukt kann Methylenchlorid bei der Herstellung verschiedener Frigene bzw. Freone auftreten.

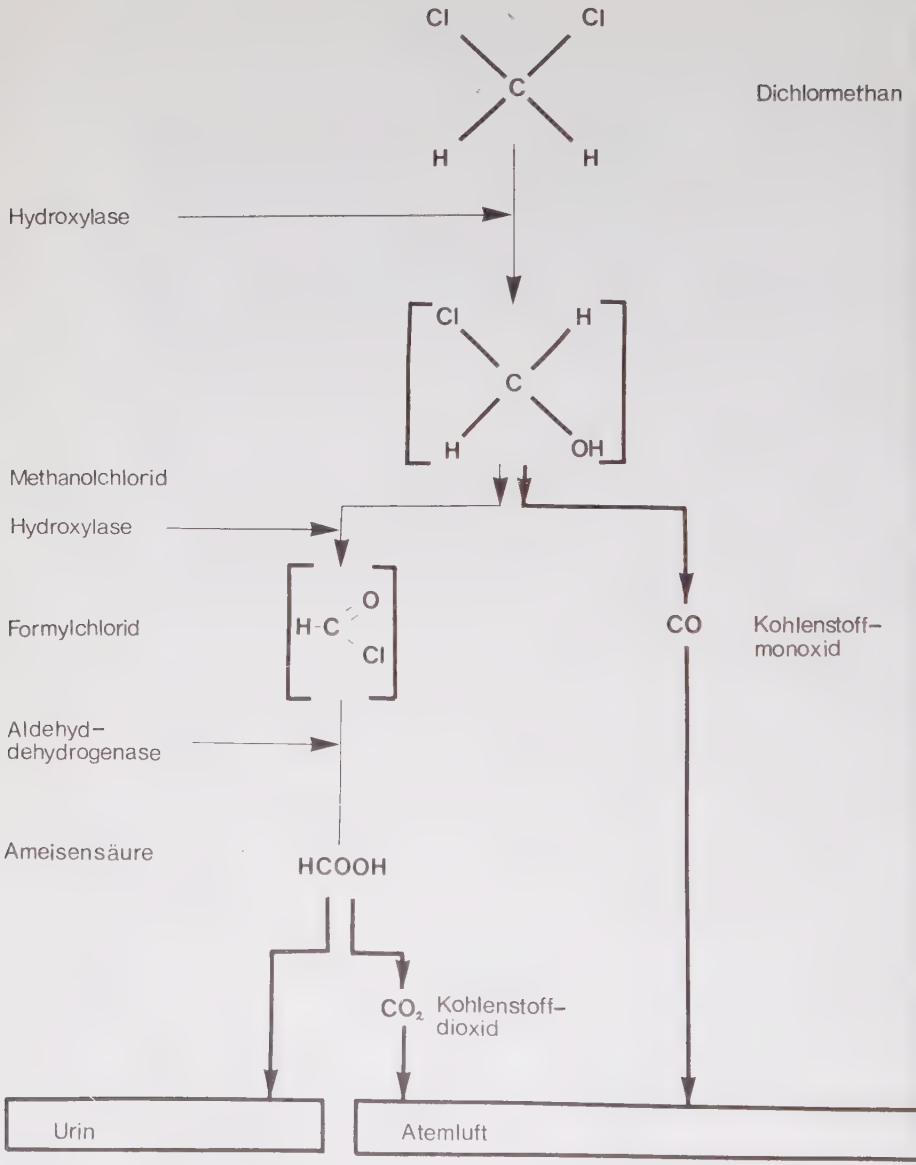
2.2. Verwendung von Dichlormethan

Dichlormethan wird seit ca. 40 Jahren in steigendem Maße als Lösungsmittel, Äther-Austauschmittel und Feuerbekämpfungsmittel verwendet. Als gutes Lösungsmittel für Fette, Öle, Chlorkautschuk, Polyvinylchlorid, Polystyrole und Polyvinylester findet es in weitem Umfang industriell Verwendung. Außerdem ist es Bestandteil von Abbeiz-, Metallentfettungs- und Fleckenreinigungsmitteln. Zudem finden wir es als Treibgaskomponente in Spraydosen und als Mischprodukt der Sicherheitskältemittel der Frigenreihe. In der Parfümerie dient Dichlormethan als Extraktionsmittel für ätherische Öle, Resinoide und ähnliche Verbindungen. Anstelle von Äther wird es labormäßig als Lösungsmittel für die Grignard-Reagenzien verwendet. Außerdem wird damit auch Coffein bei der Herstellung von coffeinfreiem Kaffee extrahiert (2).

2.3. Metabolismus von Dichlormethan

Seit 1972 ist bekannt, daß Dichlormethan im Organismus von Mensch und Tier teilweise zu Kohlenstoffmonoxid metabolisiert wird (3,4). Der Mechanismus dieser Biotransformation ist als enzymatische Leistung der mischfunktionellen Oxygenasen möglicherweise über die Bildung des instabilen Formylchlorids als Zwischenprodukt aufgeklärt worden (5; siehe Abbildung 1 auf Seite 6).

Abb.1 Xenometabolismus des Dichlormethans (verändert nach Zorn (6))



Das gleiche gilt auch für die Umsetzung von Dibrommethan und Dijodmethan. Bei Einwirkung von Tetrachlorkohlenstoff oder Phenobarbital vermindert sich das Ausmaß der Kohlenoxidbildung (7). Die gleichzeitige Gegenwart von Äthylalkohol hemmt ebenfalls die Kohlenoxidbildung (8). Die Versuche mit ^{13}C - markiertem sowie mit ^{14}C - markiertem Dichlormethan erbrachten den eindeutigen Beweis der direkten Umsetzung zu Kohlenoxid (6).

Das metabolisch gebildete Kohlenoxid hemmt das Eisen im katalytischen Zentrum von P 450, dem Hämprotein der mischfunktionellen Oxygenasen. Dabei ist die Applikationsart nicht ausschlaggebend, da nach intraperitonealer, subkutaner, perkutaner bzw. nach peroraler Verabreichung Kohlenstoffmonoxid im Blut nachgewiesen wurde (4).

Außerdem verstärkt Dichlormethan die Fähigkeit zu Kohlenoxidbildung bei wiederholter oder längerfristiger Exposition durch Induktion von P 450 und NADPH - Cytochrom - Reduktase; dies ergaben Untersuchungen bei Ratten nach 24-stündiger Exposition von 2.500 - 3.500 ppm. Höhere Konzentrationen von Dichlormethan hemmen ihrerseits den oxidativen Abbau von Äthylalkohol, wie z.B. die Exposition mit 4.200 ppm Dichlormethan über 4 Stunden an Ratten zeigte (8).

In vitro Versuche zum Metabolismus von Dichlormethan in Rattenleber-Fraktionen sollen als Produkte Formaldehyd und anorganische Halogenide liefern (5). Die Biotransformation wurde bei den in vitro Versuchen durch die Faktoren Zeit, Temperatur, Proteinkonzentration und pH - Wert determiniert. Die Stoffwechselraten der Dihalogenmethane zeigten folgende Gesetzmäßigkeiten:

$CH_2J_2 > CH_2Br_2 > CH_2BrCl > CH_2Cl_2$

Die Vorbehandlung mit Phenobarbital bei den in vitro Versuchen hatte sowohl einen Anstieg der microsomalen Cytochrom P - 450 - Rate als auch eine Erhöhung der Umwandlungsrate von Dihalogenmethan zu Kohlenstoffmonoxid zur Folge (5,7,10).

Die Lagerung der Microsomen bei $4^{o}C$ ergab eine Reduktion. Als weitere Hemmfaktoren erwiesen sich Äthylmorphin und Hexobarbital. Erforderliche Faktoren für die Umwandlung in Rattenleberfraktionen waren entsprechend dem enzymatischen Prozeß NADPH und molekularer Sauerstoff (10).

2.4. Maximaler Arbeitsplatz - Konzentrationswert/ Biologischer Arbeitsstoff - Toleranzwert

M A K (DFG) 100 ppm
360 mg/m^3

Die "kritische Toxizität" von Dichlormethan besteht in der Besetzung von Hämoglobin durch den Dichlormethan-Metaboliten Kohlenstoffmonoxid (11,12,13). Die Menge der gebildeten Metaboliten (z.B. CO) ist abhängig vom Produkt $\bar{c}$. t der Luftkonzentration an Dichlormethan und der Expositionszeit.

Die Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen Luftkonzentration und Dichlormethan im Blut erfolgt in etwa so schnell wie beim Trichlormethan (14). Während einer 8-stündigen kontinuierlichen Exposition im MAK-Bereich wird in guter Nährung ein linearer Anstieg des COHb-Spiegels beobachtet. Nach der Exposition fällt der COHb-Spiegel mit einer Halbwertszeit von ca. 10 Stunden ab. Ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Elimination von Kohlenstoffmonoxid wird während einer 8-stündigen Exposition somit nicht erreicht; einer Änderung der Expositionsbedingungen folgt der COHb-Spiegel nur mit großer Zeitverzögerung (12).

Aus den experimentellen Daten nach Di Vincenzo und Kaplan (15) muß der Schluß gezogen werden, daß das allein führende Kriterium für die Höhe des resultierenden COHb-Spiegels der 8-Stunden-Mittelwert der Dichlormethanexposition ist. Die Wirkung sehr kurzfristiger Dichlormethanexpositionen kann, wie Bolt zeigt, die Beachtung weiterer Faktoren fordern (11).

Für eine Regelung zulässiger Dichlormethan-Spitzenkonzentrationen muß nach Bolt die Möglichkeit eines "Symptomwandels" in Betracht gezogen werden, da bei Konzentrationen oberhalb von 500 ppm mit dem Auftreten zentralnervöser Effekte (pränarkotische sedierende Effekte) gerechnet werden muß (12). Bei Anwendung eines Überschreitungsfaktors von maximal 5 wäre ein solcher "Symptomwandel" vermieden. Eine 30-minütige "Spitze" von 5 x 100 = 500 ppm wäre verbunden mit der Bildung von etwa 0,7 bis maximal 1 % COHb; zwei solche "Spitzen" würden demgemäß zu 1,5 bis maximal 2 % COHb führen. Dies erscheint bei einem "endogenen" COHb-Spiegel von ca. 0,6 % (bei Nichtrauchern) und einem biologischen Grenzwert von 5 % COHb als tolerabel (13).

Da die initiale Halbwertszeit von Dichlormethan im Blut mit weniger als 30 Minuten sehr kurz ist (12, 15), ist nach Bolt bei zwei "Spitzen", die über eine Schicht verteilt werden, zu erwarten, daß der biologische Grenzwert von 1 mg Dichlormethan pro Liter Blut eingehalten wird (11). Einmalige Expositionen gegenüber 200 ppm Dichlormethan von einer Stunde führen im Mittel zu Blutspiegeln von 0,7 mg/l zum Ende der Exposition.

2.5. Toxikologie von Dichlormethan

2.5.1. Toxikologie beim Menschen

Über den gewerblichen und nichtgewerblichen Umgang mit Dichlormethan liegen vereinzelt Berichte vor, die zum Teil akute Vergiftungen bis hin zum tödlichen Ausgang beschreiben (16,17,18,19). Das Lungenödem und/oder das Hirnödem stehen dabei im Vordergrund, in keinem Fall jedoch Störungen der Leber- und Nierenfunktion. Der Rauschzustand ist symptomatisch bei leichteren Vergiftungen; außerdem wird einmalig von einer leichten Verminderung des Hb-Wertes und der Erythrozytenzahl berichtet (20).

Auch ein Einzelfall einer toxischen Encephalose mit optischen und akustischen Halluzinationen nach einer mehrjährigen Exposition mit Dichlormethan ist zu finden (19).

Tödlich endete die orale Aufnahme von 240 ml Dichlormethan (21). Bei experimenteller Kurzzeitinhalation wurden folgende Symptome beobachtet:

Konz. in ppm	Symptome	Lit.
bis 310	Geruchsschwelle	(22)
830 - 1150	nach 20 min. Schwindel	(22)
1730	nach 5 min. Schwindel	(22)
2300	Geruch unangenehm; nach 30 min. Erbrechen	(23)
2730	Geruch unangenehm; nach 8 min. Parästhesien an Extremitäten, nach 16 min. Tachycardie, nach 20 min. Hitzegefühl, Blutdrang im Kopf	(23)

Im Konzentrationsbereich von 300 - 800 ppm wurde eine Beeinträchtigung der Aufmerksamkeit in akustischen Vigilanz-Testen und ein Abfall der Flimmerverschmelzungsfrequenz nachgewiesen, was eine Leistungsminderung und eine Arbeitsfähigkeitseinschränkung zur Folge hatte (24).

In betriebshygienischen Studien werden als subjektive Beschwerden der exponierten Personen Kopfschmerzen, Müdigkeit bei der Arbeit, Reizung der oberen Atemwege und der Konjunktiven, neurasthenische Beschwerden, Verdauungsbeschwerden und Ekzeme an Hand und Unterarm angegeben. Objektive Untersuchungsbefunde erbrachten jedoch keine Normabweichungen. Als einziges Faktum fand sich eine vermehrte Ameisensäureausscheidung im Urin. Leider gab es bei diesen Studien keine genauen Konzentrationsangaben (17).

In einer weiteren Untersuchung blieb die 30-minütige Exposition von 22, 400, 800 bzw. 1000 ppm Dichlormethan ohne Einfluß auf das Leistungsvermögen (25).

Bei Fliesenlegern, die wechselnden Konzentrationen zwischen 350 und 5000 ppm ausgesetzt waren, wurde die Ausbildung einer toxischen Encephalose (EEG-Veränderungen, unspezifische vegetative Störungen und neurasthenische Beschwerden) beschrieben (26). Die jeweilige Expositionsdauer und die Häufigkeit der Exposition wurde dabei jedoch nicht festgehalten.

Es liegen mehrere systematische Studien zur Kinetik und zum Ausmaß der Kohlenstoffoxidbildung bei definierter Dichlormethanexposition beim Menschen vor.

Konz. in ppm	Zeitdauer	COHb-Spiegel	Anzahl Personen	Lit.
100	8 Std. 5 Tg[x)]	5-6 %	3	(27)
500	8 Std. 5 Tg[x)]	13-15 %	5	(27)
250	1 Std.	1,3 %	24	(28)
250	3 Std.	3 %	18	(28)
500	7 1/2 Std.	10 %	5	(28)
250	7 1/2 Std.	7 %	35	(28)
100	7 1/2 Std.	3,2 %	11	(28)
50	7 1/2 Std.	1,6 %	11	(28)
500	2 Std.	5,5 %	14	(29)
250	2 Std.	3,2 %	15	(29)

x) 30 min. Mittagspausenunterbrechung

Im allgemeinen ist festzustellen, daß die Beeinträchtigung des menschlichen Wohlbefindens sehr unterschiedlich und wenig objektivierbar ist, wobei teilweise das Dichlormethan selbst, als auch teilweise das Kohlenstoffmonoxid für die Symptome verantwortlich sind.

Kasuistische Beiträge von Stewart zeigen, daß bei Malerarbeiten mit Lackfarben, die in Methylenchlorid gelöst sind, infolge schneller Verdunstung ein erheblicher COHb-Anstieg mit objektivierbaren cardialen Symptomen und Befunden entsprechend der CO-induzierten Hypoxie auftraten (30).

2.5.2. Toxikologie bei Tieren

Bei den Ergebnissen der tierexperimentellen Befunde waren primär die akute Inhalationstoxizität, die einmalige orale Zufuhr von Dichlormethan und die wiederholte bzw. langfristige Exposition, die meist durch Zufuhr von flüssigem Dichlormethan auf enteralem bzw. parenteralem Wege erfolgte, zu unterscheiden. In den zwei folgenden Tabellen sind die Ergebnisse bei Ratten, Katzen und Kaninchen berücksichtigt.

- Ergebnisse der akuten Inhalationstoxizität mit Dichlormethan

Tierart	Konz. in ppm/Zufuhr	Expos.-Dauer	Befund	Lit.
Ratten	25.000	90 min	tödlich	(31,32)
Ratten	16.000 - 18.000	6 std	tödlich/tiefe Narkosen und Tod	(31,32)
Ratten	15.000	8 std	überlebt	(31)
Ratten	15.000	518 sec	Narkosegrad I	(31)
Ratten	15.000	1.317sec	Narkosegrad IV	(31)
Ratten	5.000	14 std	Störungen im Schlaf- und Wachverhalten	(32)
Katzen	24.200	13 min	leichte Narkose nach 7 - 9 min, tiefe Narkose nach 11 - 13 min	
Katzen	17.700	21 min	leichte Narkose nach 13 - 16 min, tiefe Narkose nach 15 - 21 min und Zyanose	(22)
Katzen	14.100	167 min	leichte Narkose nach 24 - 25 min, tiefe Narkose nach 68 - 167 min	(22)
Katzen	11.200	110 min	leichte Narkose nach 72 - 90 min, tiefe Narkose nach 103 - 110 min	(22)
Katzen	10.800	293 min	leichte Narkose nach 164 - 220 min, tiefe Narkose nach 273 - 293 min	(22)
Ratten	1,6 - 29 oral gegeben		LD 50	(33)

- Ergebnisse mit wiederholter und langfristiger Exposition mit Dichlormethan

Tierart	Konz. in ppm/Zufuhr	Expos.dauer	Symptome	Lit.
Ratten	10.000	6 std/tgl 7 Tg/Wo- 13 Wo	leichte Reizung der Konjunktiven; keine klinisch-chemischen oder histologischen Veränderungen an parenchymatösen Organen	(21)
Ratten	1.325	8 std/tgl	keine path. Veränderungen bis 75. Tag, danach leichte Leberatrophie, Verfettung und Zellinfiltration	(34)
Katzen	7.200	4-8 std/tgl 6 Tg/Wo-4 Wo	nach 6-8 std Koordinationsstörungen. Sektion: Fettinfiltration in Leber und Niere	(35)
Katzen	1.720-2.300	8-9 std/tgl	Tiere schläfrig, Körpertemperatur fallende Tendenz	(22)
Kanin.	2.800	8 std/tgl	keine Beeinträchtigung, Leber o. B.	(34)

Die Ergebnisse zeigen keine Einheitlichkeit, weder nach einmaliger noch nach wiederholter Gabe. Dies gilt auch für die Konzentration und die Zufuhrart.

Zusätzlich müssen tierexperimentelle Versuchsergebnisse des Dichlormethanmetaboliten Kohlenstoffmonoxid berücksichtigt werden. Aufgrund von Untersuchungen an Katzen, Kaninchen und Ratten kann zu dem Problem der Einwirkung von Kohlenstoffmonoxid auf die für Organe, wie Gehirn und Leber, und für die aerobe Glykolyse wichtige Sauerstoffmenge folgendes gesagt werden (35):

1. Die Abnahme des intrazellulären Sauerstoffpartialdrucks bei CO-exponierten Tieren folgt im Gewebe nahezu reziprok linear dem Anstieg der CO-Sättigung im Blut
2. Nach Einstellung eines Gleichgewichts zwischen CO-Konzentration in der Einatemluft und dem Blut (Kohlenoxid-steady-state) wird bei Werten über 6 bis 8 % COHb eine anhaltende weitere pO_2-Abnahme bei jedoch flacherem Abnahmegradienten über eine Dauer bis zu 20 Minuten beobachtet (Sauerstoffschuldeffekt)
3. Bei Beendigung der CO-Exposition und Einatmung reiner Luft erfolgt der Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe erst nach einer Latenzzeit von 2 bis 10 Minuten. Die Zeitspanne der Rückkehr zum Ausgangswert des pO_2 vor der CO-Exposition folgt den aus den Arbeiten über die CO-Elimination bekannten Daten; sie kann durch Einatmen reinen Sauerstoffs verkürzt werden. Somit ist der Einfluß mäßiger CO-Konzentrationen gekennzeichnet durch eine eindeutig reziproke Beziehung zwischen dem Sauerstoffpartialdruck und dem COHb-Wert im Bereich von 3 bis 30 %. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei ungünstigen Perfusionsverhältnissen schon niedrige CO-Konzentrationen zu kritischen pO_2-Werten im Gewebe führen.

3. PROBLEMSTELLUNG

Während über die Toxikologie beim Säugetier zahlreiche Daten vorhanden sind, fehlen weitgehend noch Angaben über die quantitative Seite des Metabolismus bzw. über die metabolischen Zwischenprodukte beim Säugetier. Aufgabe dieser Arbeit war es, diese toxikokinetischen Effekte des Dichlormethan bei mehreren Säugetieren experimentell zu untersuchen.

4. Experimenteller Teil

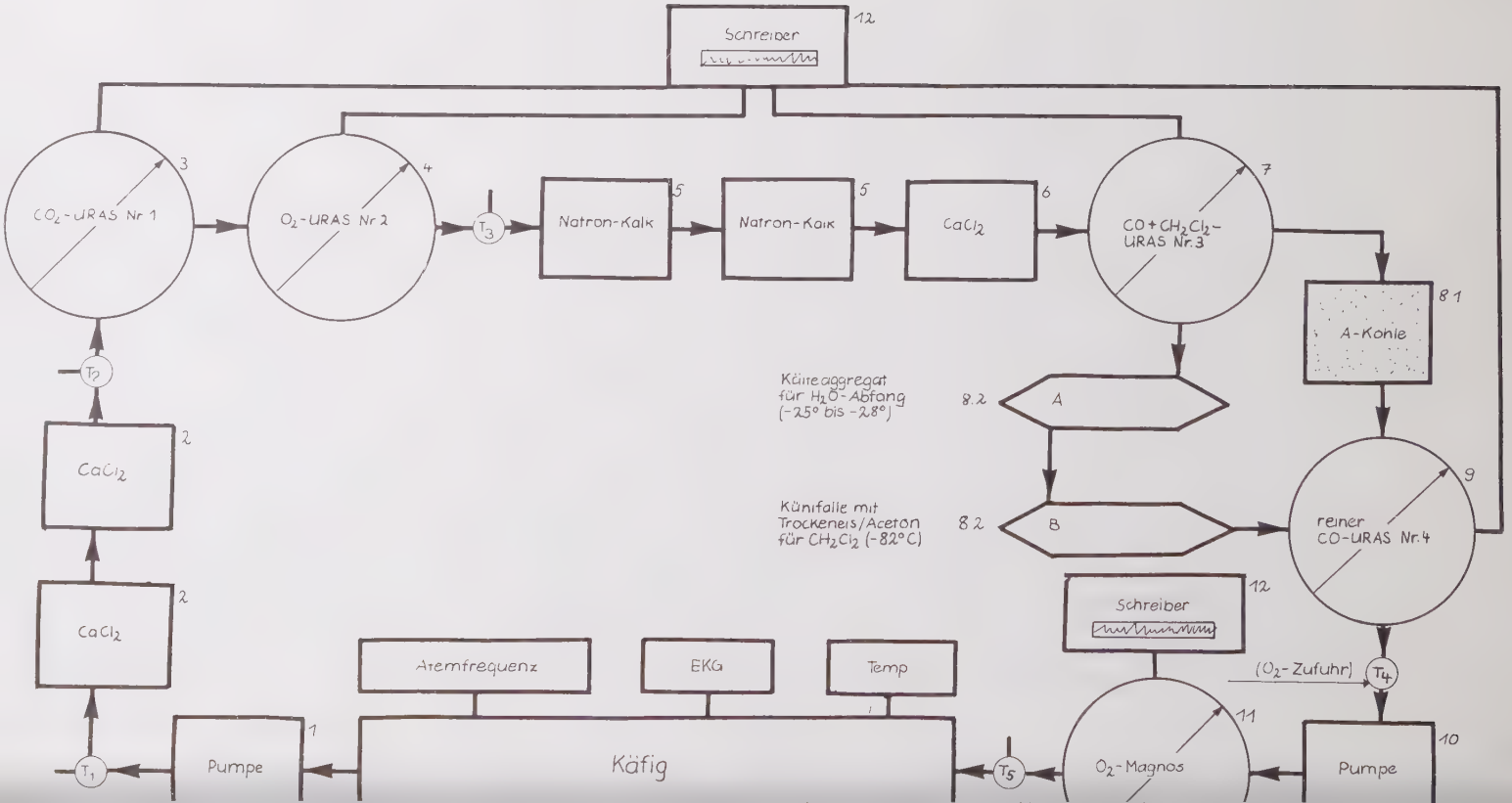
4.1. Aufbau der Experimentalanlage

Die Tierexperimente wurden mit der in Abbildung 2 auf Seite 22 dargestellten Versuchsanlage durchgeführt. Die in der Skizze aufgeführten Ziffern beziehen sich auf die der Käfigeinheit angeschlossenen Einheiten der Anlage. Die Messungen erfolgten während eines Versuchs kontinuierlich.

Käfigeinheit mit Versuchstier:

Der Käfig bestand aus Glas und Metallteilen und war luftdicht verschließbar. In ihn wurde das kurz zuvor mit Ketanest (Ketamin-Hydrochlorid) und Rompun (Xylazin-Hydrochlorid) narkotisierte und mit Dichlormethan exponierte Versuchstier gelegt. An dem Tier selbst wurden gemessen: Atemfrequenz mittels Dehnungsstreifen, EKG mittels Stichelektroden und Rektaltemperatur mittels eingeführter Elektrode. Im Käfig wurde mit einem Thermometer laufend die Temperatur registriert.

Abb. 2 Versuchsanordnung



Erklärung der Versuchsanordnung in Abbildung 2:

1. Absaugpumpe für den Versuchskäfig
2. Zwei Trockeneinheiten mit $CaCl_2$ zum Feuchtigkeitsabfang
3. Messung des CO_2-Gehalts durch Infrarotanalysegerät "URAS" Nr. 1
4. Messung des O_2-Gehalts durch Infrarotanalysegerät "URAS" Nr. 2
5. Zweimalige Filterung mit Natronkalk zur CO_2-Absorption
6. Weitere Trockeneinheit zur Feuchtigkeitsabsorption
7. Gemeinsame Messung von CO- und $CHCl_2$-Konzentration durch Infrarotanalysegerät "URAS" Nr. 3

8.1. Filterung mit Aktivkohle zum Abfang relativ geringer CH_2Cl_2-Konzentrationen

8.2. CH_2Cl_2-Rückgewinnung bei hohem Konzentrationsanteil an CH_2Cl_2 durch zwei hintereinandergeschaltete Kühlfallen. Kühlaggregat A mit Temperaturen von - 25° C primär für H_2O- und teilweise für CH_2Cl_2-Konisation. Kühlaggregat B mit Trockeneis/Acetonfüllung und einer Temperatur von - 82° C für die Abtrennung des CH_2Cl_2 vom CO der Abatemluft.

9. Messung des von Störfaktoren getrennten CO im Luftgemisch mit Infrarotanalysegerät "URAS" Nr. 4
10. Zufuhrpumpe für den Versuchskäfig
11. Messung des O_2-Gehalts mit Infrarotanalysegerät "MAGNOS" und angeschlossener Schreibeinheit für die Messung der dem Käfig zugeführten Luft.

12. Schreibeinheit für die gleichzeitige Registrierung der Meßdaten aus URAS Nr. 1-4

T-Stücke: Für die Gasentnahme mit Hilfe einer "Gasmaus" zur gaschromatographischen Auswertung. Zusätzlich war am T-Stück Nr. 4 bei der Sauerstoffabnahme eine sofortige Korrektur des Sauerstoffgehalts möglich.

4.2. Gaschromatographische Analytik

Die Analytik der Gasproben bzw. der Blutproben mit Hilfe der Gasraumanalyse erfolgte mit einem Gaschromatographen der Firma Perkin - Elmer, Typ F 22 mit angeschlossenem Schreiber und folgenden Bedingungen:

Trägergas:	Helium 2 bar bzw. Stickstoff 1,6 bar Argon/Methan 40 ml/min
Säule Nr. 1:	Polyäthylenglykol 1.500 (Länge 4 m)
Säule Nr. 2:	Apiezol L (Länge 4 m)
Säule Nr. 3:	Silikon 550 (Länge 4 m)
	Ofentemperaturen (in Grad C)
Bei Säule Nr. 1:	70-80-150
Bei Säule Nr. 2:	90-110-150
Bei Säule Nr. 3:	110-130-150
Detektoren:	FID: 1 x 4/16 x 2 ECD: 0,5 x 4/16 x 2
Dampfraum-injektor:	4 min 40 ^{o}C/50 ^{o}C bzw. manuelle Bedienung
Schreiberge-schwindigkeit:	300 mm/h bzw. 600 mm/h

4.3. Beurteilung der gaschromatographischen Analytik - Verfahren

4.3.1. Nachweisgrenze

Als Eichlösung wurde ein Gemisch aus Citratblut (Blut: Citrat = 10 : 1), Dichlormethan, Trichloräthylen, Formalin (Formaldehydlösung mind. 35 %ig) und Tetrachloräthylen verwandt. Der Konzentrationsbereich der zu prüfenden Kohlenwasserstoffe befand sich anfangs im Größenbereich von 5.000 ppm und wurde stufenweise bis auf 10 ppm und darunter gesenkt. In Bereichen unter 10 ppm ging die Präzision über die relative Standardabweichung von $\pm$ 2 s hinaus, so daß diese nicht mehr gegeben war. Damit war die Nachweisgrenze bei 10 ppm zu ziehen.

4.3.2. Präzision der einzelnen Säulen

Säule	Anzahl der Eichmessungen	relative Standardabweichung s in %	Streubereich u in %
Polyäthylenglykol 1.500	17	$\pm$ 2	$\pm$ 4
Apiezol L	6	$\pm$ 5	$\pm$ 12
Silikon 550	40	$\pm$ 1	$\pm$ 2

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Tierversuche fast immer mit der Silikon 550 - Säule durchgeführt.

4.4. Eingesetzte Tiere

Als Versuchstiere waren 7 Katzen, 4 kastrierte Kater (Nr. 1 - 4), 1 Kater, 4 Kaninchen (3 männliche aus einem Wurf und 1 weibliches) und 6 weibliche Wistar-Ratten eingesetzt. Die Einzeldaten der Tiere waren:

Tierart	Gewicht in g	Alter bei Versuchsbeginn in Jahren
Katze Nr. 1	2.200	1
Katze Nr. 2	2.500	3
Katze Nr. 3	2.400	0,5
Katze Nr. 4	2.800	0,5
Katze Nr. 5	2.300	1
Katze Nr. 6	2.100	2
Katze Nr. 7	1.800	1
kastr. Kater Nr. 1	3.800	5
kastr. Kater Nr. 2	4.900	5
kastr. Kater Nr. 3	3.300	4
kastr. Kater Nr. 4	4.500	4
Kater Nr. 5	3.000	1
Kaninchen Nr. 1	5.300	1
Kaninchen Nr. 2	5.000	1,5
Kaninchen Nr. 3	5.100	1,5
Kaninchen Nr. 4	4.200	1
Ratte Nr. 1	320	1
Ratte Nr. 2	290	1
Ratte Nr. 3	280	1
Ratte Nr. 4	240	1
Ratte Nr. 5	260	1
Ratte Nr. 6	310	1

4.5. Versuchsdurchführung

4.5.1. Narkosemittelgabe

Die Tiere wurden vor jedem Versuch mit einem Gemisch aus Ketanest (Ketamin-Hydrochlorid) als Narkotikum, Rompun (Xylazin-Hydrochlorid) als Muskelrelaxanz und Atropin narkotisiert. Das Gemisch wurde unter die Halshaut gespritzt. Es wurden folgende Dosen verabreicht:

Tierart	Ketanest 50[1)]	Rompun[1)]	Atropin[1)]
Katzen	0,1	0,2	0,1
Kaninchen	1	0,5	0,1
Ratten	0,5	0,2	0,1

[1)] Angaben in ml/kg Körpergewicht

4.5.2. Dichlormethaninjektion

Nachdem die Tiere voll narkotisiert waren - dies war in der Regel spätestens nach 8 - 10 min nach Gabe des Narkotikumgemischs der Fall - wurde ihnen ein Gemisch aus Dichlormethan und Öl bzw. Dichlormethan/Äthanol und Öl intraperitoneal injiziert (Mischungsverhältnisse Dichlormethan : Öl = 1 : 4 bzw. Dichlormethan : Äthanol : Öl = 1 : 1 : 4). Danach wurde das jeweilige Versuchstier in den Versuchskäfig gelegt, der anschließend luftdicht verschlossen wurde.

Es erfolgte die CO_2-, O_2-, CH_2Cl_2- und CO-Konzentrationsbestimmung im geschlossenen "Kreislaufsystem" unter Berücksichtigung der O_2-Zugabe und der Gasabsorption. Die O_2-Konzentration wurde innerhalb des Systems über das T-Stück Nr. 4 konstant gehalten.

4.5.3. Zeitpunktbestimmung der Blutentnahme

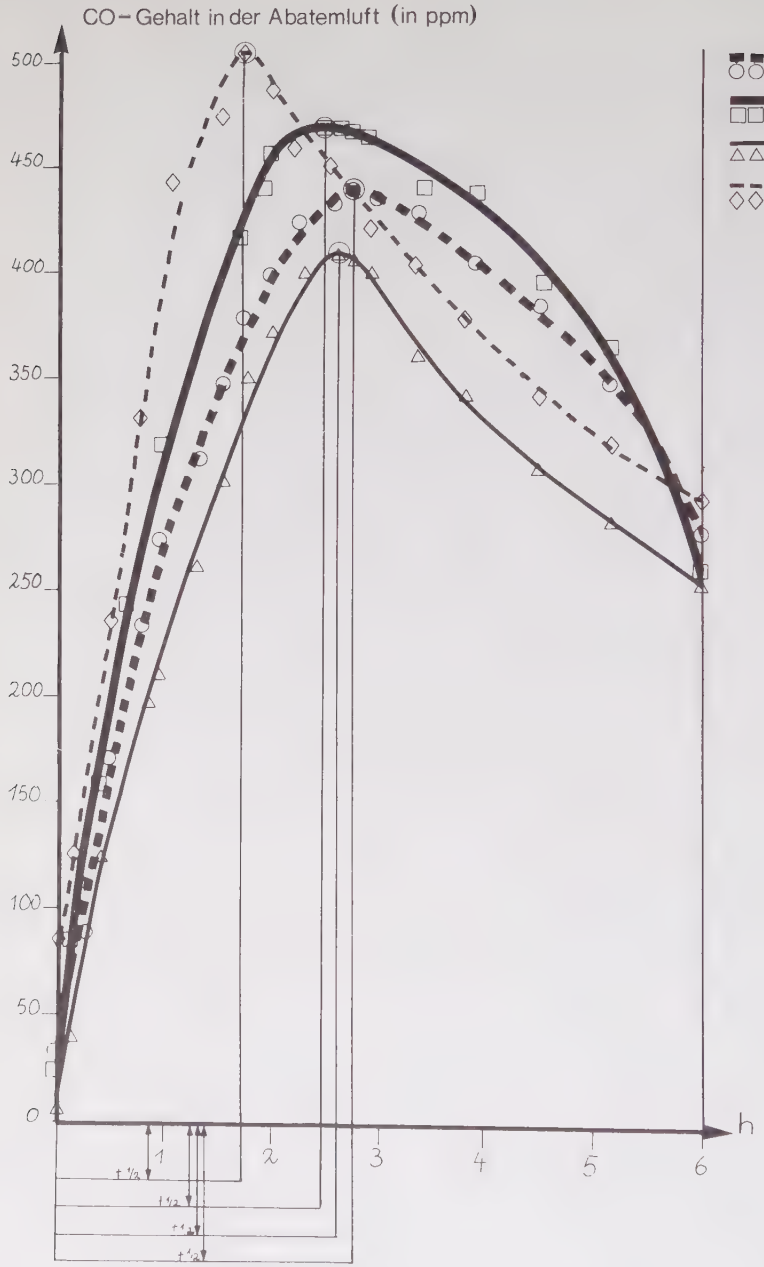
Zu diesem Zweck wurden jeweils
Kater Nr. 1 mit 3mmol/kg,
Kater Nr. 2 mit 4,5mmol/kg,
Kaninchen Nr. 1 mit 1,5mmol/kg und
Kaninchen Nr. 2 mit 3mmol/kg
Dichlormethan i.p. injiziert. Die Messung der Konzentrationen der Exhalation erfolgte 6 Stunden lang. Wichtig war hierbei der CO-Gehalt der Abatemluft, da CO als

1. Endstufe des Metabolismus bewiesen war,

2. Indikator der Metabolismusrate dann dienen kann, wenn sich eine mathematisch erfaßbare Korrelation zwischen Zeitablauf nach i.p.-Injektion und abgeatmetem CO-Gehalt ergibt.

Die Versuchsergebnisse sind in der Abbildung 3 auf Seite 30 dargestellt.

Abb.3 Bestimmung des Zeitpunks der Blutentnahme



Zeitpunkt der maximalen Konzentration der Abatemluft

Die maximale CO-Konzentration in der Abatemluft wurde zwischen 1,7 und 2,7 Stunden nach der Dichlormethan-Injektion erreicht. Da der Anstieg bis zu diesem Zeitpunkt nahezu linear war, wurde die Zeit bis zum Erreichen der maximalen CO-Konzentration halbiert, weil anzunehmen war, daß sich zu diesem Zeitpunkt das Dichlormethan und verschiedene Metabolite im Blut befanden. Diese halbierten Zeitwerte lagen zwischen 0,85 und 1,35 Stunden . Aufgrund dieses Ergebnisses wurde bei allen folgenden Tierversuchen die Blutabnahme eine Stunde nach der Dichlormethan-Injektion vorgenommen.
Die Blutabnahme erfolgte stets intracardial, wobei jeweils ca. 5 ml Blut bei Katzen und Kaninchen und ca. 1 ml Blut bei Ratten entnommen wurden.

4.5.4. GC-Bestimmungen

Das Blut des jeweiligen Versuchstiers wurde sofort anschließend mit Hilfe der Dampfraumanalyse gaschromatographisch ausgewertet. Nach Beendigung des Versuchs - nach Erwachen des Versuchstiers - wurden die während des Versuchs über die T-Stücke gewonnenen Gasproben analysiert und mit den Ergebnissen der Meßsysteme in der Versuchsanlage verglichen.

4.5.5. Tod von Versuchstieren

In der gesamten Beobachtungszeit starben in kurzfristigem Zusammenhang mit der "Exposition" keine Tiere. Die später verstorbenen 5 Katzen, 3 Kater, 3 Kaninchen und 6 Ratten wurden nach Eintritt des Todes innerhalb von 48 Stunden obduziert. Auffällige Organe bzw. Organteile wurden entnommen und nach Mikrozerkleinerung auch mit der Gasraumanalyse ausgewertet.

4.5.6. Einzelne Konzentrationsangaben und Anzahl der CH_2Cl_2-Injektionen

Tier	Anzahl der Injektionen	CH_2Cl_2-Konzentration in mmol/kg	Zeitraum in Jahren über den die Injektionen in gleichmäßigen Abständen verteilt wurden
Katze Nr. 1	10	1,56	4
Katze Nr. 2	6	1,56	3
Katze Nr. 3	4	3,12	3
Katze Nr. 4	4	3,12	3
Katze Nr. 5	4	3,12	3
Katze Nr. 6	2	7,80	2
Katze Nr. 7	4	4,68	3
Kater Nr. 1	10	3,12	4
Kater Nr. 2	10	4,68	4
Kater Nr. 3	6	6,24	3
Kater Nr. 4	14	1,56	4
Kater Nr. 5	6	6,24	3
Kaninchen Nr. 1	2	1,56	0,5
Kaninchen Nr. 2	6	3,12	2
Kaninchen Nr. 3	6	3,12[+)]	3
Kaninchen Nr. 4	4	1,56[+)]	1
Ratte Nr. 1	1	0,78	
Ratte Nr. 2	1	1,56	
Ratte Nr. 3	1	3,12	
Ratte Nr. 4	1	3,12	
Ratte Nr. 5	1	4,68	
Ratte Nr. 6	1	7,80	

[+)] Injektion von Äthanol : CH_2Cl_2-Gemisch = 1 : 1

5. ERGEBNISSE

5.1. Gasanalytik

5.1.1. Exhalationsprodukte

Folgende Exhalationsprodukte konnten identifiziert werden:

CH_2Cl_2
CO
CO_2
O_2

Sie wurden innerhalb der Versuchsanlage mit Hilfe der Infrarotanalysegeräte "URAS" aufgezeichnet; außerdem wurden CH_2Cl_2 und CO gaschromatographisch quantitativ bestimmt.

5.1.1.1. Dichlormethan

Bei allen Tieren, die mit Dichlormethan intraperitoneal gespritzt worden waren, konnte Dichlormethan in der Abatemluft registriert werden. Dies bedeutet, daß infolge einer Metabolisierungsgeschwindigkeit mittleren Grades Teile des Dichlormethans zu der Halbwertszeit noch nicht metabolisiert waren und daher teilweise über die Lungen exhaliert werden konnten. Dabei schwankte der Prozentsatz sowohl von Tierart zu Tierart, als auch innerhalb der Tierart selbst und bei wiederholter Gabe auch bei den einzelnen Tieren. Somit ist quantitativ nur eine Aussage mit großem Streubereich möglich.

Von der intraperitoneal eingespritzten Menge Dichlormethan wurden 25 % über die Lungen exhaliert.

5.1.1.2. Kohlenstoffmonoxid

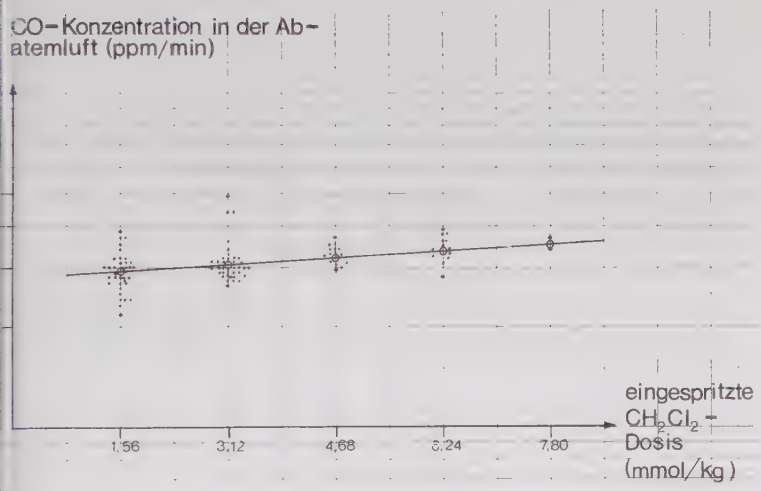
Bei allen mit Dichlormethan exponierten Tieren konnte CO als Endprodukt des Metabolismus aufgezeichnet werden. Der Zeitablauf der CO-Exhalation entsprach dem in Punkt 4.5.3. wiedergegebenen Kurvenverlauf.

Bei der Verdoppelung der Ausgangsmenge wurde eine um ca. 20 - 25 % höhere CO-Konzentration in der exhalierten Luft des Versuchstiers registriert; bei einer Verdreifachung, Vervierfachung oder Verfünffachung ergab sich maximal eine Steigerung um 40 %. Offensichtlich besteht eine logarithmische Funktion zwischen Dichlormethan-Dosis und der zu CO metabolisierten Menge, begrenzt durch eine Quantitätsgröße eines metabolisierenden Enzyms oder mehrerer metabolisierender Enzyme (siehe Abbildung 4 auf Seite 35).

5.1.1.3. Nachweis der Inhibition des Dichlormethanmetabolismusses durch Äthylalkohol

Bei den Kaninchen Nr. 3 und Nr. 4 wurden die in 4.5.6. angegebenen Mengen Äthanol und Dichlormethan gespritzt. Anschließend wurde der CO-Konzentrationsanstieg kontinuierlich in der Versuchsanlage mit Hilfe der Infrarotanalysegeräte "URAS" abgelesen. Dabei zeigte sich, daß bei der zusätzlichen Gabe von Äthylalkohol der CO-Anstieg in der Exhalationsluft sich verlangsamte. Die maximale CO-Konzentration wurde nach 2,5 - 4,5 Stunden erreicht. Dies entsprach ungefähr einer Verdoppelung des Zeitfaktors der Metabolisierung.

Abb.4 Eingespritzte Dichlormethan-Dosis/CO-Konzentration in der Abatemluft (halblogarithmisch aufgezeichnet)



37	35	15	12	3	Anzahl der Messungen
2,63	3,15	3,32	3,45	3,58	Mittelwert d. CO-Konz. (ppm/min)
3,18–3,84	2,68–4,90	2,94–3,67	2,81–3,90	3,44–3,72	Extremwerte d. CO-Konz. (ppm/min)

5.1.2. Gaschromatographische Auswertung in der Dampfraumphase des Blutes der mit Dichlormethan exponierten Tiere

Sowohl Dichlormethan selbst als auch Kohlenstoffmonoxid als Metabolit des Dichlormethan konnten analysiert werden. Das häufig postulierte Zwischenprodukt Formylchlorid war nicht nachweisbar. Bei der Instabilität von Formylchlorid erschien es verständlich, daß dieser intermediäre Metabolit nicht nachgewiesen werden konnte. Versuche mit weiteren Dihalogenmethanverbindungen, um z.B. ein Formylfluorid zu erfassen, scheiterten an der geringen Menge von Monofluormonochlormethan, die für den Versuch synthetisiert werden konnte.

5.1.3. Gaschromatographische Analytik bei einzelnen Organen exponierter Tiere

5.1.3.1. Fettgewebe

Bei allen obduzierten Tieren konnte im Fettgewebe nicht metabolisiertes Dichlormethan nachgewiesen werden. Dabei war die Dichlormethankonzentration mit der Fettmenge der Tiere bzw. der einzelnen Organe und der verabreichten Konzentration proportional. Außerdem nahm die Konzentration im Fettgewebe mit der Applikationshäufigkeit zu. Dichlormethan wird somit im Fettgewebe des Körpers in einem relativ hohen Maße (Mittelwert: ca. 40 %) gespeichert.

5.1.3.2. Herz

Im Herzmuskelhomogenisat fand sich nur eine geringe Dichlormethankonzentration. Diese dürfte wahrscheinlich auf die Vascularisation des Herzmuskels zurückzuführen sein. Andere Zwischenprodukte waren nicht nachweisbar; Kohlenstoffmonoxid war im Myocard nicht in meßbarer Größe zu erfassen.

5.1.3.3. Hirn und Liquor

Nach Öffnung des Schädels verstorbener Tiere wurde der Liquor in einem Gefäß aufgefangen und mit der Hirnmasse zusammen homogenisiert. Bei der Dampfraumanalyse war bei allen Tieren Dichlormethan nachweisbar. Die Konzentration des Hirnhomogenisats lag dabei über der Konzentration des Blutes. Sämtliche Daten sprechen daher dafür, daß Dichlormethan die Bluthirnschranke passieren und sich im Hirn- bzw. Nervengewebe einlagern kann. Dies steht in Übereinstimmung mit den morphologisch - neurologischen Beobachtungen wie sie unter 5.2. näher ausgeführt sind.

5.1.3.4. Hoden

Bei zwei Kaninchen fielen einen Tag nach der intraperitonealen Dichlormethaninjektion stark geschwollene, druckschmerzhafte Hoden auf. Da die Schwellung bei einem Tier weiterhin zunahm, wurde dieses eingeschläfert. Bei der anschließenden sofortigen Öffnung des Skrotums waren beide Hoden pflaumengroß angeschwollen und stark gerötet. Auffällig war beim Aufschneiden beider Hoden der Geruch nach Dichlormethan. Die Hoden wurden mikrozerkleinert, homogenisiert und getrennt mittels Dampfraumanalyse gaschromatographisch untersucht. Beide Hoden enthielten ausschließlich Dichlormethan; andere Metabolite waren nicht nachweisbar.

5.1.3.5. Leber

Bei der Dampfraumanalyse waren im Leberhomogenisat ebenfalls außer Dichlormethan keine Metabolite nachzuweisen. Auffällig war die starke Vergrößerung der Leber, die durch einen hohen Verfettungsgrad bedingt war.

5.1.3.6. Lungen

Dichlormethan konnte auch Tage nach der intraperitonealen Gabe von Dichlormethan im Homogenisat identifiziert werden. Weitere Metabolite waren nicht auffindbar.

5.1.3.7. Quantitative Verteilung von Dichlormethan innerhalb des Organismus

Das Blockdiagramm Nr. 1 auf Seite 41 zeigt die Mittelwerte in Prozent der Ausgangsmenge/Applikation von Dichlormethan in den einzelnen Organen bei den obduzierten Tieren. Zu berücksichtigen dabei ist, daß diese Werte aus einem sehr großen Streubereich gemittelt wurden und daß eine unterschiedliche Exposition häufig bei den einzelnen Tieren vorlag. Außerdem erfolgte die Untersuchung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der intraperitonealen Dichlormethan-Applikation.

Die Relation von Blut-/Leber-Dichlormethan-Konzentration beträgt 1; sie ist durch die "direkte" Durchblutung bei intraperitonealer Injektion zu erklären.

Dem lipophilen Charakter des Dichlormethans entsprechend ist sein wesentlicher Anteil im Fettgewebe wieder zu finden.

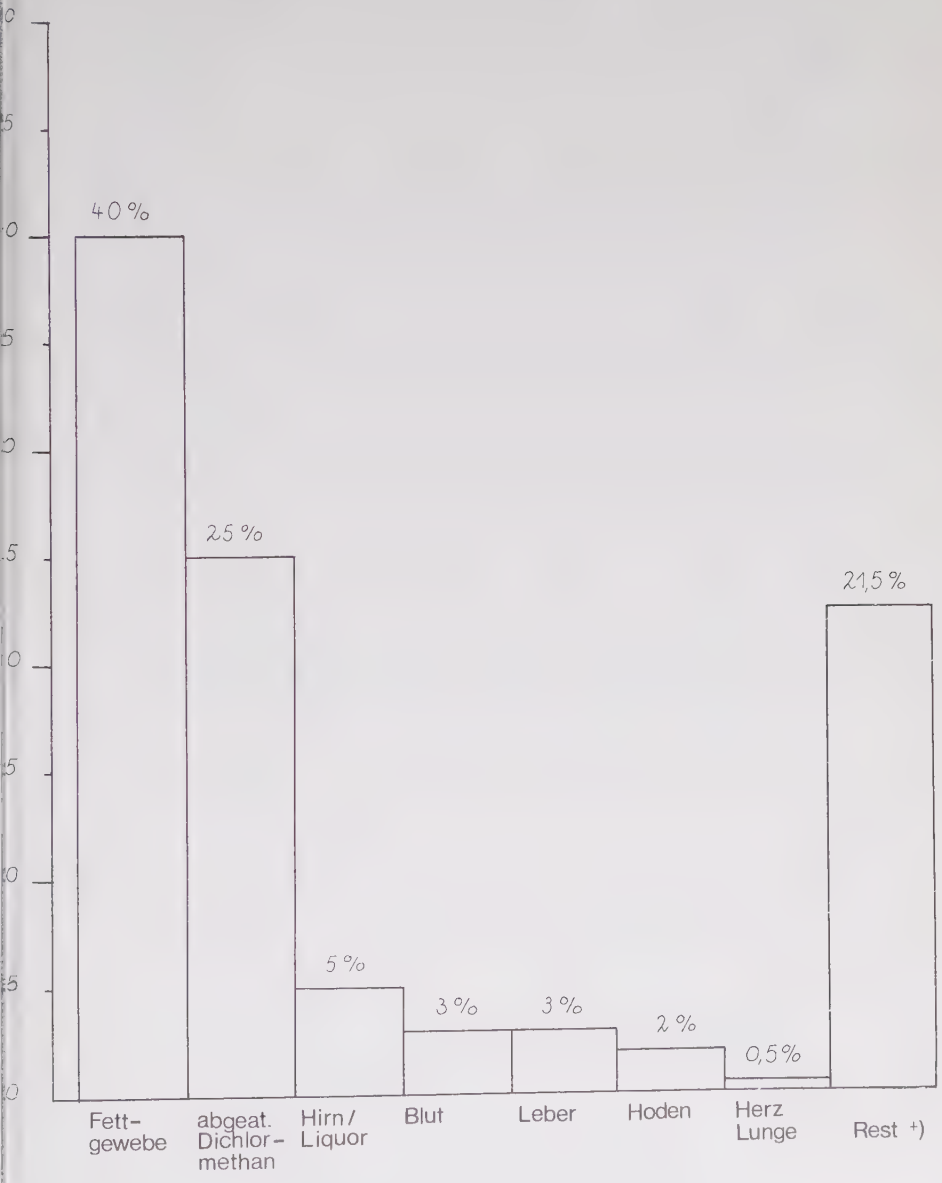
Weniger leicht erklärbar ist der relativ hohe Dichlormethan-Anteil in den Hoden, besonders wenn man an den geringen Fettanteil der Hoden denkt.

Demgegenüber ist der Dichlormethanvolumenanteil im Gehirn aufgrund der Lösungsbedingungen leicht zu definieren.

Der Rest der Organe ist wesentlich durch die Skelettmuskulatur bestimmt. Sie verhält sich prinzipiell wie das Myocard. Dabei dürfte im wesentlichen die niedere Dichlormethan-Konzentration in diesen Geweben durch die relativ schnelle Metabolisierung zu Kohlenstoffmonoxid bedingt sein.

Blockdiagramm Nr.1
Organverteilung von Dichlormethan
in % der Ausgangsmenge

Mittelwert von Dichlormethan
in der Ausgangsmenge / Applikation



+) größtenteils abgeatmetes CO

5.2. Symptome und klinisch-chemische Befunde bei den mit Dichlormethan exponierten Tieren

5.2.1. Beidseitige Miosis nach Dichlormethanexposition

Die Miosis trat bei den Katzen Nr. 4 - 7 und den Katern Nr. 2, Nr. 3 und Nr. 5 auf. Zwischen 6 und 7 Tagen hielt die Miosis bei den Tieren an, die mit 6,24 mmol/kg Dichlormethan/Applikation und mehr jeweils gespritzt waren. Dabei trat die Miosis sofort nach der ersten Applikation auf. Bei der Katze Nr. 7 und dem Kater Nr. 2 (4,68 mmol/kg Dichlormethan/Applikation) dauerte die Miosis 3 bis 4 Tage und trat nach der zweiten Applikation auf. Die Tiere, die mit 3,12 mmol/kg Dichlormethan/Applikation exponiert waren, hatten in zwei Fällen gar keine Miosis (Katze Nr. 3 und Kater Nr. 1); die zwei übrigen Tiere dieser Gruppe (Katze Nr. 4 und 5) wiesen nach der dritten Applikation eine für ein bis zwei Tage anhaltende Miosis auf. Diejenigen Tiere, die 1,56 mmol/kg Dichlormethan/Applikation erhalten hatten, wiesen selbst nach 14 Applikationen (Kater Nr. 4) niemals eine Miosis auf.

Tabelle zur Miosis

Konzentration von CH_2Cl_2/ Applikation (mmol/kg)	Anzahl der Katzen und Kater	Anzahl der Tiere mit Miosis	Dauer der Miosis in Tagen	Auftreten der Miosis nach der x-ten Applikation
1,56	3	keine	keine	keine
3,12	4	2	1 - 2	3
4,68	2	2	3 - 4	2
6,24 und 7,80	3	3	6 - 7	2

- Schwellenwert bei einmaliger Applikation
  Ein akuter Dosisschwellenwert liegt im Bereich zwischen 5 und 6 mmol/kg Dichlormethan/Applikation vor; dieser induziert sofort eine lang anhaltende beidseitige Miosis.

- Schwellenwert bei mehrfacher Applikation
  Ein Additionseffekt kann angenommen werden, da bei 3,12 mmol/kg Dichlormethan/Applikation eine kurz andauernde Miosis erst nach der dritten Einspritzung auftrat, während er bei höherer Konzentration längerfristig anhielt und frühzeitiger auftrat.
  Zu vermuten ist außerdem, daß eine Mindestdosis von ca. 3 mmol/kg Dichlormethan/Applikation notwendig ist, um ein Miosisphänomen auszulösen.

Beide Ergebnisse gelten nur für Katzen und Kater, bei Kaninchen und Ratten war niemals eine Miosis zu beobachten.

5.2.2. Fellveränderungen

Das Struppig- und Stumpfwerden des Felles zeigte ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit und einen Summationseffekt. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Tierarten ergab sich jedoch nicht. Die Tiere, die mit 1,56 mmol/kg Dichlormethan/Applikation exponiert waren, zeigten erst nach der dritten Applikation ein leichtes bis mäßiges Abstumpfen ihres Fells. Ab der vierten Applikation trat auch die Struppigkeit deutlich hinzu. Beide Erscheinungen verstärkten sich dann mit jeder weiteren Einspritzung. Bei den Tieren mit höheren Applikationsdosen war dieser Effekt sofort nach der ersten Dichlormethanspritze zu sehen. Dabei war die Fellschädigung um so gravierender, je höher die Konzentration war.

Hervorzuheben ist, daß der Dichlormethaneffekt nicht durch das Dichlormethan der Ausatemluft verursacht sein konnte, da die Versuchsanordnung keine Dichlormethananreicherung in der Raumluft zuließ. Außerdem befanden sich die Tiere nach Erwachen aus der Narkose in der normalen Tierstalluft, der Effekt war nur über den intravasalen Dichlormethaneffekt zu erklären.

5.2.3. Herzrhythmusstörungen

Alle Tiere zeigten sofort nach der Exposition in der EKG - Schreibung gehäuft Extrasystolen, die sich mit der Konzentrationshöhe des eingespritzten Dichlormethans deutlich häuften. Während der ersten zwei Stunden nach der Applikation blieb die Extrasystolenzahl fast gleich hoch und fiel dann langsam ab. Selbst nach einer Woche waren bei den Tieren noch immer vereinzelte Rhythmusstörungen im Sinne von Extrasystolen nachweisbar. Bei Konzentrationen von über 6 mmol/kg Dichlormethan/Applikation trat immer sofort nach Einspritzung Vorhofflimmern mit Kammereigenrhytmus mit einer Frequenz um 40/min auf. Dieses hielt ca. 1 Stunde an, gefolgt von einem AV-Block mit einer 1:2 bzw. 1:3 Überleitung wahrscheinlich im Sinne eines "Ermüdungsblocks". Auch hier erfolgte eine Normalisierung nur sehr langsam.

Mit steigender Applikationshäufigkeit verlangsamte sich die Rückbildung der induzierten Herzrhythmusstörungen. Nach der 8. Applikation von 1,56 mmol/kg Dichlormethan traten die gleichen Herzrhythmusstörungen, nur kurzzeitiger wie bei 6 mmol/kg Dichlormethan/Applikation, auf. Eine Erklärung dieser gleichsam als Adaption deutbaren Extrasystolenfunktion des Dichlormethans dürfte darin liegen, daß die Extrasystolen nicht nur auf die Halogenkohlenwasserstoffwirkung selbst zurückzuführen sind, sondern auch durch die die Flimmerschwelle des Myocards senkende Wirkung des Dichlormethanmetaboliten Kohlenstoffmonoxid mitbedingt sind.

5.2.4. Hodenentzündungen/Fertilitätsstörungen

Die relativ hohe Dichlormethankonzentration in den Hoden läßt sich trotz der intraperitonealen Injektionsart nicht rein mechanisch erklären. Eine chemische Funktionsbeeinflussung bei höheren Dichlormethankonzentrationen ließ sich am Hoden nicht ausschließen.

Über die beobachteten Hodenschwellungen bei Kaninchen wurde in Punkt 5.1.3.4. berichtet. Hinzuzufügen ist, daß sich zumindest bei den männlichen exponierten Kaninchen eine Herabsetzung der Fertilität ergab. Dies ist daraus zu schließen, daß die Kaninchen (ein weibliches und drei männliche Tiere) ständig in einem Käfig zusammen waren. Die Männchen besprangen zwar häufig das Weibchen, es kam auch zu Ejakulationen, aber es stellte sich kein Nachwuchs ein. Das Weibchen war nicht exponiert und hatte zuvor mehrere gesunde Würfe.

5.2.5. Tetanische Anfälle

Diese traten bei den betroffenen Tieren sofort nach der Applikation auf. Dabei waren tonische Krämpfe aller vier Extremitäten häufig mit der entsprechenden Starre der Gesichts- bzw. der Rumpfmuskulatur zu beobachten. Zusätzlich kam es zur Dorsalflexion des Kopfes, der Mund war geöffnet und verharrte in "Gähnstellung". Eine gleichzeitige starre Pupillenerweiterung war ebenfalls zu beobachten. Das EKG zeigte eine Erniedrigung der R-Zacke und eine Abflachung der T-Welle. In zwei Fällen konnte eine leichte Erhöhung der Körpertemperatur registriert werden.

Die tetanischen Anfälle zeigten keine lineare Konzentrationsabhängigkeit und traten sofort nach der Exposition auf. Sie wiederholten sich jeweils nach der folgenden Dichlormethaneinspritzung, dauerten zwischen 20 und 60 Sekunden und endeten ohne Therapie schlagartig. Außer nach Exposition waren diese Anfälle bei den Tieren nie zu beobachten. Eine Streßreaktion der Tiere konnte durch die gleichartige Behandlung aller Tiere und die gleichartige Handhabung der Injektion ausgeschlossen werden.

5.3. Laborchemische Parameter

5.3.1. Klinisches Blutbild

Bei allen Versuchstieren gab es während des Beobachtungszeitraums nur geringfügige Veränderungen im Blutbild. Nach Applikation von Dichlormethan war ein leichter Anstieg der Leukozytenzahl um 10 - 20 % ohne lineare Konzentrationsabhängigkeit zu registrieren; gleichzeitig kam es meist zu einem minimalen Abfall der Erythrozytenzahl. Beide Parameter waren aber spätestens nach einer Woche wieder im Normbereich.

5.3.2. Veränderungen von Serumenzym- bzw. Serumsubstratwerten

Folgende Parameter wurden überwacht:
GOT, GPT, CHE, AP, LDH und Gesamtbilirubin.

- Verhalten bei einmaliger Applikation

Unabhängig von der Tierart kam es je nach Dichlormethankonzentrationshöhe/Applikation zu einem unterschiedlich hohen Anstieg von GOT/GPT, wobei das Verhältnis dieser zwei Transaminasen ständig gleich blieb. Folgende Tabelle zeigt den Anstiegsfaktor in Abhängigkeit von Dichlormethankonzentration/Applikation.

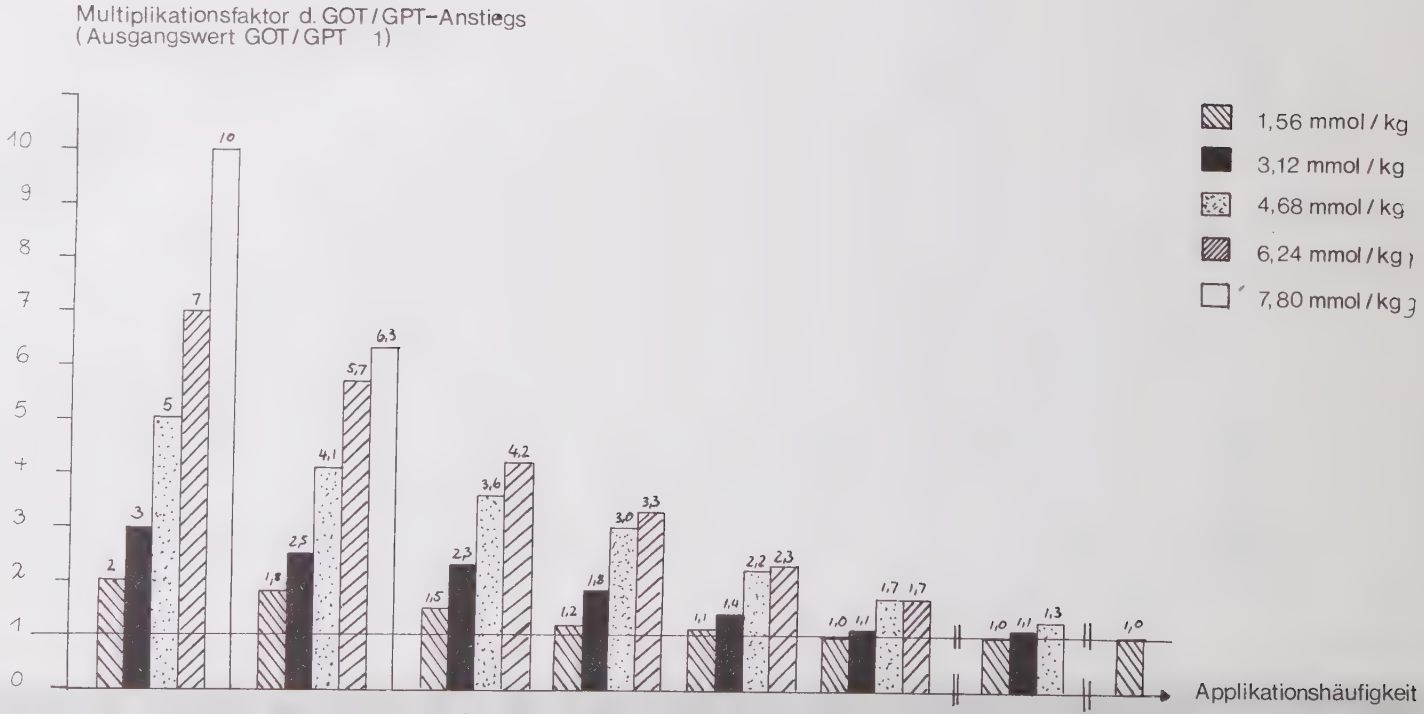
Dichlormethankonzentration/ Applikation nach einmaliger Gabe	GOT/GPT Anstiegsfaktor
0,78 mmol/kg	0
1,56 mmol/kg	2
3,12 mmol/kg	3
4,68 mmol/kg	5
6,24 mmol/kg	7
7,80 mmol/kg	10

AP, LDH und Gesamtbilirubin zeigten nach einmaliger Gabe keine signifikanten Veränderungen von ihren Ausgangswerten. Es wurde lediglich eine minimale Erhöhung der Serumcholinesterase registriert, die aber nur als Trend und nicht als signifikant bezeichnet werden kann.

- Verhalten bei mehrmaliger Applikation

Hier war charakteristisch, daß mit zunehmender Applikationszahl der Anstiegsfaktor von GOT/GPT immer kleiner wurde und sich nach der 10. Applikation kaum noch von den Ausgangswerten unterschied (siehe Blockdiagramm Nr. 2 auf Seite 50). Dies spricht für einen "Anpassungseffekt" der Mitochondrien, z.B. im Sinne einer Enzyminduktion. Das Verhältnis GOT/GPT änderte sich auch hier bei den einzelnen Tieren, individuell bezogen, nicht.

Blockdiagramm Nr. 2
GOT/GPT-Anstieg bei Applikation
unterschiedlicher Dichlormethankonzentrationen
und steigender Anzahl der Applikationen



Auch das AP und LDH änderten sich während der gesamten Kontrolldauer bei den Tieren nicht.

Die Veränderungen bei der Serumcholinesterase waren minimal. Nach den ersten und zweiten Applikationen war eine minimale Erhöhung der Ausgangswerte zu registrieren. Ab der dritten Applikation kam es bei einzelnen Tieren sogar zu einem leichten Abfall, der sich aber nicht fortsetzte.

Das Gesamtbilirubin verhielt sich von Tier zu Tier und von Applikation zu Appliaktion sehr different; es war nur die Tendenz zu einem leichten Anstieg mit steigender Anzahl der Applikationen zu registrieren.

6. Diskussion

6.1. Metabolismus

Kohlenstoffmonoxid als wesentliches Ausscheidungsprodukt des Dichlormethanmetabolismus konnte bewiesen werden. Dieses Endprodukt wurde 1972 entdeckt (3,4). Das hypothetische Zwischenprodukt Formylchlorid ergab sich innerhalb dieser Arbeit nicht. Bei der Abklärung des Metabolismus beim Säugetier und beim Mensch wäre es sowohl für den analytischen Nachweis als auch aus toxikodynamischer Sicht wichtig zu wissen, in welcher Form das Formylchlorid im Xenometabolismus vorliegt als Monomer oder als Polymer bzw. als Proteinaddukt. Zu bedenken wäre auch, ob nicht beim Metabolismus von Dichlormethan eine Disproportionierung stattfindet, bei der ein C = C-Körper - im Sinne von Dichloräthanol - als Zwischenprodukt entstehen könnte. Dabei müßte außer einer Trichlorverbindung eine entsprechende Tetrachlorverbindung aufzufinden sein. Die endgültige Aufklärung des Dichlormethanmetabolismus ist letztendlich eine Frage der Kinetik und der Beständigkeit der entsprechenden Zwischenprodukte. Eine Abklärung in dieser Richtung könnte das Dichlormethan nicht selbst, sondern z. B. das Monofluormonochlormethan erbringen, da sich das chemisch "inerte" Fluor in vivo wie in vitro völlig anders verhält als die anderen Halogene oder deren entsprechende Verbindungen.

Die quantitative Seite des Metabolismus von Dichlormethan ist durch das Ausmaß der Lipophilie von Dichlormethan charakterisiert. 40 % der ursprünglichen Menge werden im Fettgewebe deponiert; 12 - 15 % verteilen sich auf die verschiedenen Körperorgane. Ein Viertel wird nach intraperitonealer Applikation direkt über die Lungen abgeatmet, so daß ca. 20 - 25 % sofort metabolisiert werden, wobei als wesentliches Endprodukt Kohlenstoffmonoxid nachzuweisen ist. Das Verhältnis des für den Metabolismus verfügbaren, das heißt, des nicht im Fettgewebe gespeicherten Dichlormethans zu dem gebildeten Volumen Kohlenstoffmonoxid beträgt 1 : 1. Diese Relation stimmt mit den seitherigen quantitativen Ergebnissen der Literatur überein; diese wurden überwiegend bei einer Dichlormethan-Exposition über die Luftwege beschrieben. Damit dürfte, wenn man den bei der intraperitonealen Exposition höheren Anteil der Fettdeponierung im peritonealen Gewebe ausnimmt, zwischen den beiden unterschiedlichen Applikationsarten (Inhalation/intraperitoneale Injektion) kein wesentlicher Unterschied bestehen.

Darüberhinaus konnte die in der Literatur beschriebene Inhibition des Dichlormethanstoffwechsels durch Äthylalkohol bestätigt werden (8).

6.2. Kinetik

Nach intraperitonealer Dichlormethaninjektion konnte nach einem nahezu linearen Anstieg eine maximale Kohlenstoffmonoxidabatmung nach 1,7 - 2,7 Stunden registriert werden. Durch Halbierung dieser Zeit wurde eine Blutspitzenkonzentration für die Metabolite auf 0,85 - 1,35 Stunden errechnet. Dies bedeutet, daß das Dichlormethan zur Passage vom Bauchraum ins Blut und zur Weiterpassage in die verschiedenen Organe nur sehr wenig Zeit braucht; die initiale Halbwertszeit von Dichlormethan beträgt damit weniger als 30 Minuten. Diese kurze initiale Halbwertszeit von Dichlormethan stimmt damit mit Messungen bei Exposition über die Lunge überein.

6.3. Speicher- und Kumulationsvorgänge bei Dichlormethanexposition

Zu berücksichtigen ist, daß mit ansteigender Konzentration und Häufigkeit der Exposition die Speicherung von Dichlormethan im Körperfettgewebe zu relativ großen Dosiswerten führt. Die Elimination des Dichlormethans dürfte den physikalischen Gesetzen der Löslichkeit und Diffusion entsprechen. Insgesamt verläuft dieser Ausscheidungsprozeß aus dem Fettgewebe nach den hier durchgeführten Tierversuchen sehr langsam.

6.4. Toxikologische Symptome

Die toxikologisch relevanten Symptome, die bei den Tieren zu beobachten wären, stimmen größtenteils mit den in der Literatur genannten (vgl. Kapitel 2) überein. Bisher nicht beschrieben wurde eine beidseitig auftretende Miosis mit einem akuten Dosisschwellenwert und einem Summationseffekt bei Mehrfachapplikation. Ob die Miosis auf die Dichlormethanvergiftung oder den Metaboliten Kohlenstoffmonoxid zurückzuführen ist, konnte nicht eindeutig entschieden werden. Bei der Vielfalt der Effekte des Kohlenstoffmonoxids auf das Zentralnervensystem scheint es wahrscheinlicher, daß ein eventuell im statu nascendi im Bereich des Ganglion cervicale craniale des Grenzstranges gebildetes Kohlenstoffmonoxid die Miosis verursacht.

Ebenfalls bisher nicht beschrieben wurde eine Hodenschwellung bei Kaninchen mit einer relativ hohen Dichlormethaneinlagerung. Zu diskutieren ist, ob die beobachtete eingeschränkte Fertilität auf das eingelagerte Dichlormethan selbst oder auf das hypothetische metabolische Zwischenprodukt Formylchlorid zurückzuführen ist, da dies durchaus solche Effekte bewirken kann. In diesem Zusammenhang scheint eine Parallele mit dem Metabolismus des Methanol zu bestehen, wo bekanntermaßen das Formaldehyd als xenometabolisches Zwischenprodukt für die Amaurose verantwortlich ist.

Über die laborchemisch registrierte Anpassung der Transaminasen bei mehrfacher Applikation fanden sich ebenfalls keine Literaturhinweise. Diese Anpassung an den Normbereich bei häufiger Applikation könnte für einen "Adaptionseffekt" der Mitochondrien im Sinne einer Enzyminduktion sprechen.

7. Zusammenfassung

Die Untersuchungen zum Dichlormethanmetabolismus erfolgten an 22 Versuchstieren. Dabei zeigte die Dichlormethanverteilung eine Speicherung im Körperfett, eine bedeutsame Abatmung des Dichlormethans selbst und etwa im gleichen Umfang eine Abatmung seines Metaboliten, des Kohlenstoffmonoxids. Die "Durchgängigkeit" der Blut-Liquor-Schranke für Dichlormethan konnte nachgewiesen und die Inhibition des Dichlormethanstoffwechsels durch Äthylalkohol bestätigt werden.

Als kinetische relevante Daten konnte nach intraperitonealer Injektion eine maximale Kohlenstoffmonoxidabatmung nach 1,7 - 2,7 Stunden aufgezeichnet werden. Bis diese Spitzenkonzentration in der Abatemluft erreicht wurde, erfolgte ein ständiger, fast linearer Anstieg des Kohlenstoffmonoxids.

Zwischenprodukte des Metabolismus von Dichlormethan zu Kohlenstoffmonoxid konnten weder im Blut noch in Organgeweben gefunden werden.

Die folgenden morphologischen und klinisch-chemischen Veränderungen wurden bei den mit Dichlormethan exponierten Tieren (7 Katzen, 5 Kater, 4 Kaninchen und 6 Ratten) festgestellt:

Befunde	Anzahl der Tiere
Auge: beidseitige Miosis, die bis zu 7 Tagen nach der Exposition anhielt	4 Katzen 3 Kater
Fell: struppig und stumpf	alle Versuchstiere
Herzrhythmusstörungen mit gehäuften Extrasystolen	alle Versuchstiere
Hoden: beidseitige starke Schwellung mit eingeschränkter Fertilität	2 Kaninchen
Tetanische Anfälle	3 Katzen 1 Kater 4 Ratten
Lebergewebsschädigung mit Transaminasenanstieg und Enzyminduktion bei mehrfacher Applikation	alle Versuchstiere

8. Literatur

1. W. Forth, D. Henschler, W. Rummel:
Allgemeine und spezielle
Pharmakologie und Toxikologie.
Wissenschaftsverlag, 580-584 (1975)

2. H. Römpp:
Chemie-Lexikon.
Frankh'sche Verlagsbuchhandlung
Stuttgart, 1476 (1968)

3. R. D. Stewart, T. N. Fischer,
M. J. Hosoko, J. E. Peterson,
E. D. Baretta, H. C. Dodd:
Carboxyhemoglobin elevation after
exposure to dichlormethane.
Sciene 1976, 295 - 296 (1972)

4. G. G. Fodor, D. Prajsnar, H.-W. Schlipköter:
Endogene CO-Bildung durch inkorporierte
Halogenkohlenwasserstoffe der Methanreihe.
Staub-Reinhalt. Luft 33, 258 - 259 (1973)

5. A. E. Ahmed, M. W. Anders:
Metabolism of dihalomethans to formaldehyde
and inorganic halide.
Drug Metabolism and Diposition 4, 357 - 361 (1976)

6. H. Zorn:
Zur Toxikologie der kohlenmonoxid-
xenometabolsierenden Halogenkohlenwasserstoffe.
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für
Arbeitsmedizin, 343 - 351 (1973)

7. A. E. Ahmed, V. L. Kubic, M. W. Anders:
Metabolism of haloforms to carbon moxide.
Drug Metabolism and Disposition 5, 76 - 82 (1977)

8. V. Kassebart, J. Angerer:
Influence of dichlormethane on the disappearance rate of ethanol in the blood of rats.
Int. Arch. Arbeitsmed. 33, 231 - 236 (1974)

9. V. L. Kubic, M. W. Anders, R. R. Engel, C. H. Barlow, W. S. Caughey:
Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide.
Drug Metabolism and Disposition 2, 53 - 57 (1974)

10. V. L. Kubic, M. W. Anders:
Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide.
Drug metabolism and Disposition 3, 104 - 112 (1975)

11. H. M. Bolt:
Zur Evaluierung zulässiger Arbeitsstoff-Spitzenkonzentrationen.
Noch unveröffentlicht

12. D. Henschler (Hrsg.):
Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten.
Verlag Chemie Weinheim,
zit. in (11).

13. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von BAT-Werten,
zit. in (11)

14. W. Bender, M. Göthert, G. Malorny, P. Sebbresse:
Wirkungsbild niedriger Kohlenoxid-Konzentrationen beim Menschen.
Arch. Toxicol. 27, 142 - 158 (1971),
zit. in (11)

15. G. D. Di Vincenzo, C. J. Kaplan:
Uptake, metabolism and elimination of methylene chloride vapor by humans.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 59, 130 - 140 (1981),
zit. in (11)

16. J. P. Hughes:
Hazardous exposure to some so-called safe solvents.
J. Amer. med. Ass. 156, 234 - 237 (1954)

17. M. Kuzelova, R. Vlasek:
Der Einfluß des Methylchlorids auf den Gesundheitszustand der Arbeiter bei der Erzeugung der Filmfolie und Verfolgung der Ameisensäure als Metabolit des Methylenchlorids.
Zbl. Arbeitsmed. 17, 252 (1967)

18. H. Collier:
Methylene dichloride intoxication in industry, report of 2 cases.
Lancet 1, 594 - 595 (1936)

19. G. Weiss:
Toxische Enzephalose beim beruflichen Umgang mit Methylenchlorid.
Zbl. Arbeitsmed. 17, 282 - 285 (1967)

20. S. Moskowitz, H. Shapiro:
Fatal exposure to methylene chloride vapor.
Arch. industr. Hyg. 6, 116 - 123 (1952)

21. H. Weigand:
Persönliche Mitteilung.
Laboratorium für Gewerbetoxikologie der
Hoechst AG, Frankfurt/M. (1976)

22. K. B. Lehmann, L. Schmidt-Kehl:
Die wichtigsten Chlorkohlenwasserstoffe der
Fettreihe vom Standpunkt der Gewerbehygiene.
Arch. Hyg. (Berlin) 116, 131 - 268 (1936)

23. W. Neumann, W. Müller:
unveröffentlichte Untersuchungen,
zit. in: K. B. Lehmann, F. Flury:
Toxikologie und Hygiene der technischen
Lösungsmittel.
Springer Berlin, 104 (1938)

24. H.-W. Schlipköter, G. G. Fodor, G. Winneke:
Gefährdung durch organische Lösemittel am
Arbeitsplatz, dargestellt am Beispiel des
Dichlormethans.
Arbeitsmed. Sozialmed. Arbeitshyg. 5,
253 - 256 (1970)

25. F. Gamberale, G. Annwall, M. Hultengren:
Exposure to methylene chloride
II. Psychological Funktions.
Scand. J. Work Environm Hlth. 1,
95 - 103 (1975)

26. C. Hanke, K. Ruppe, J. Otto:
Untersuchungsergebnisse zur toxischen Wirkung von Dichlormethan bei Fußbodenlegern.
Z. ges. Hyg. 20, 81 - 84 (1974)

27. G. G. Fodor, A. Roscovanu:
Erhöhter Blut-Co-Gehalt bei Mensch und Tier durch inkorporierte halogenierte Kohlenwasserstoffe.
Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig., 162, 34 - 40 (1976)

28. J. E. Peterson:
Modeling the uptake, metabolism and excretion of dichlormethane by man.
Amer. Ind. Hyp. Assoc. J. 39, 41 - 47 (1978)

29. J. Astrand:
Effects on humans of solvents in the inspiratory air, a method of extimation of uptake.
Environ. Res. 15 (1), 1 - 4 (1978)

30. R. D. Stewart, C. L. Hake:
Paint remover hazard.
J. amer. med. Assoc. 235, 398 - 401 (1976)

31. H. Schumacher, F. Grandjean:
Comparative studies on the narcotic effectiveness and acute toxicity of 9 solvents.
Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. 18, 109 - 119 (1960)

32. G. G. Fodor:
Zur Problematik der Festlegung maximaler Arbeitsplatzkonzentrationen für organische Lösungsmittel, dargestellt am Beispiel des Dichlormethans.
Bericht über den II. Kongreß für Arbeitsschutz und Arbeitsmed. 1969 in Düsseldorf, Herausgeber: Deutsche Gesellschaft für Arbeitsschutz e.V., Heidelberg, Haug, 308 - 316 (1970)

33. Unpublished data:
Biochemical Research Laboratory,
the DOW Chemical Company

34. E. Gross:
unveröffentlichte Untersuchungen,
zit. in (22)

35. H. Zorn:
Der Sauerstoff-Partialdruck im Hirngewebe und in der Leber bei subtoxischen Kohlenmonoxid-Konzentrationen.
Staub-Reinhalt, Luft 32, 151 - 155 (1972)

LEBENSLAUF

Am 19. April 1951 wurde ich, Norbert Gerhard Zwiker, als Sohn des Bankbeamten Gerhard Zwiker und dessen Ehefrau Margot, geborene Schulz, in Stuttgart geboren. Ich besuchte folgende Schulen und Universitäten:

1958 – 1962	Altenburgschule II in Stuttgart-Bad Cannstatt
1962 – 1970	Gottlieb-Daimler-Gymnasium in Stuttgart-Bad Cannstatt (Abschluß: Allgemeine Reifeprüfung)
Oktober 1970:	Immatrikulation in den Fächern Biologie und Chemie an der Universität Hohenheim
Dezember 1975:	Staatsexamen in den Fächern Biologie und Chemie
April 1976:	Immatrikulation im Fach Medizin
April 1977:	Wechsel an die Medizinische Fakultät der Universität Tübingen
März 1978:	Ärztliche Vorprüfung
August 1980:	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1981:	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1981:	Beginn des Praktischen Jahres am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart-Bad Cannstatt
23. April 1982:	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit dem 1. Mai 1982 arbeite ich als Assistenzarzt in der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung des Kreiskrankenhauses Backnang (Rems-Murr-Kreis).

Am 7. Dezember 1973 heiratete ich die Kunststudentin Heidemarie Steinegger. Unser Sohn Raoul wurde am 22. August 1981 geboren, unsere Tochter Muriel am 5. Oktober 1982.